

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 55-153713

(43)Date of publication of application : 29.11.1980

(51)Int.Cl.

A61K 9/14

(21)Application number : 54-054283

(71)Applicant : KUREHA CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 02.05.1979

(72)Inventor : WATANABE TAKATOSHI

(54) PHARMACEUTICAL PREPARATION OF RIBOSOME CONTAINING ACTIVE SUBSTANCE

(57)Abstract:

PURPOSE: The title reboseme pharmaceutical preparation having a high strength of wall membrane and improved prolonged release of an active substance, containing an active substance in its vacuole, obtained by forming the wall membrane wherein a specific amount of oily substance molecules exist in the bimolecular layer of phospholipid.

CONSTITUTION: A wall membrane, wherein 3W20wt%, preferably 5W15wt% of oily substance molecules existin the bimolecular layer of phosphlipid, e.g., Lecithin, is formed and contains an active substance in its vacuole. The oily substance is one compound selected from the group consisting of mineral oil, wax, triglyceride, or their mixture. The ribosome has a complex emulsion form of water in oil in water type (W/O/O type), and more improved retention ability of the active substance than conventional phospholipid micell type emulsion. The ribosome is suitable as a protective for a drug unstable in the living body or one having side effect and useful as a medicine.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁 (JP)
⑩ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開
昭55—153713

⑫ Int. Cl.⁸
A 61 K 9/14

識別記号 庁内整理番号
7057—4C

⑬ 公開 昭和55年(1980)11月29日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全19頁)

⑭ 活性物質含有リボゾーム製剤

⑮ 特 願 昭54—54283
⑯ 出 願 昭54(1979)5月2日
⑰ 発 明 者 渡辺孝寿

坂戸市鶴舞2—5—7
⑱ 出 願 人 呉羽化学工業株式会社
東京都中央区日本橋堀留町1丁
目8番地
⑲ 代 理 人 弁理士 宮田広豊 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

活性物質含有リボゾーム製剤

2. 特許請求の範囲

- (1) リン脂質の2分子層内に油性分子が混在または結合してなる膜材をリボゾームの壁膜とすることを特徴とする活性物質含有リボゾーム製剤。
- (2) リン脂質がレシテンである特許請求範囲第1項記載のリボゾーム製剤。
- (3) 膜材が租レシテン単独、あるいはこれと油性分子との混合物からなる特許請求範囲第1項記載のリボゾーム製剤。
- (4) 油性分子が植物油、ロウまたはトリグリセリド単独、もしくはこれらの混合物である特許請求範囲第1項乃至第3項のいずれかに記載のリボゾーム製剤。
- (5) トリグリセリドが植物油類である特許請求

範囲第4項記載のリボゾーム製剤。

- (6) 膜材中の油性分子含有量が3〜30重量%である特許請求範囲第1項乃至第5項のいずれかに記載のリボゾーム製剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明は活性物質を含有するリボゾーム製剤に関する。更に詳しくは、カプセル膜材として、租レシテンの如き、一般式X—Y(式中、Xは極性親水性基を、Yは非極性親水性基を示す)で表わされる①リン脂質と②ステロールおよび③トリグリセリドで代表される如き油性物質を含有する物質を単独で用い、或いは一般式X—Yで表わされる化合物と前記の油性物質との混合物を用いて得られる2分子層内に、一般式X—Yで表わされる物質以外の油性物質を混在又は結合せしめて成る、いわゆる複合エマルジョン的な製剤を有するリボゾームの内腔に活性物質を含有せしめたリボゾーム製剤に関する。

従来、薬物を生体内に直接投与した場合には
(1)薬物に対する投与増強と云う免疫学的問題、
(2)薬物が臓器以外の組織にまでも取り込まれて生ずる副作用拡大の問題、あるいは逆に、(3)薬物が臓器の組織を通過し難いために生ずる問題、更に
(4)薬物が体内酵素による分解その他で活性を維持し難い問題の生ずる場合が多い。これらの問題の多くは、薬物を保護しつつ臓器の組織に直接に運び得る担体があれば、これを利用して薬物の運搬途中の分解を抑えることなどによつて解決可能となる。

特開昭49-118826号は、上記問題を解決し得る担体として、一般式 $X-Y$ （式中、 X は塩性親水性基を、 Y は非塩性親水性基を示す）で表わされる化合物、例えばレシチン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンなどの純粋なリン脂質を用いて作った少なくとも1層の2分子層を有する閉鎖ラメラ（ミセル）構造を

- 3 -

以上では、流出速度の著しい上昇が起る。

これらの欠点のうち、膜の強度を改良するためには、コレステロールなどのステロール系脂質を膜材に混在せしめることが提案されている。しかし、この方法で膜に柔軟性を与えることによつて膜の強度は幾分増大するが、徐放性は未だ充分には改良されていない。従つて、膜の強度と、徐放性とを共に満足せしめるリボゾームはまだ提案されていないのである。

本発明者は上記問題を解決し得る新規なリボゾーム用膜材を提供すべく研究した結果、レシチンを原料とするリボゾームが従来の純粋なリン脂質を原料としたリボゾームに比べて、特異な挙動を示すこと、即ち柔軟性に富むと同時に内腔中の物質の、特に生体内（*in vivo*）における徐放性に優れることを見出した。更に詳述すると、本発明者は、上記レシチンからなるリボゾームと、従来の純粋なリン脂質、例えばレシチンからなるリ

- 5 -

特開昭55-153713(2)
特許小冊、即ちリボゾーム（前掲の第1図参照）の提供を暗示している。このリボゾームの内腔水中に活性物質を取り込ませて成る製剤は、細胞または有害な周囲の条件下、例えば胃腸内に於ても、細胞が内腔内の活性物質を保護しているので、経口投与が可能である。またこの製剤はその緩衝性に依りて組織に対する浸透性が変化するゆえに、適切な粒径に調節することによつて浸透性を高めることが可能である。従つて選択的に特定の組織へ活性物質を送ることを可能にするものとして極めて注目されている。

しかしながら、このようなリボゾームは第1図からも明らかなごとく、純粋な一般式 $X-Y$ で表わされる物質、特にリン脂質からなつていて膜の柔軟性に欠けていると共に、膜の強度も劣っており、かつ内腔に含まれている活性物質の外部への流出速度が速大であつて、徐放性の点では必ずしも満足ではない。特に脂質のグルーゾル型移動膜

- 4 -

リボゾームとを詳細に比較考察する内に、担体レシチンからなるリボゾームの前記の特長挙動は、2分子層内に油性分子が混在または結合していることに起因するとの結論に達し、本発明を完成した。

即ち、本発明は活性物質を取り込ませたリボゾーム製剤として、一般式 $X-Y$ で表わされるリン脂質に加えて、トリグリセリドのごとき油性分子を共存せしめて成る膜材を盛膜とするリボゾームの内腔に活性物質を含有せしめて成る、生体内に於ける徐放性に優れた $W/O/W$ 複合エマルジョン型の新規なリボゾーム製剤を提供することを目的とする。

本発明の特徴は、盛膜としてリン脂質のミセル層内に油性物質分子が混在または結合している膜材を用いることにあるが、この油性物質分子の存在が製造工程に於てはカプセル収率の向上および、従来の超音波処理によるリボゾーム形成後の分離・徐放性の向上に伴う分離操作の容易化を来し、製

- 6 -

- 6 -

劑としては収量の均一性、粒子の集積性、膜強度の向上、良好な再分散性を与えると共に生体内における徐放性の著しい改善をもたらすことは極めて鋭くべきことである。

これらの効果の理論的説明は未だ完成されていないが、従来の結晶リン脂質ミセル型リポゾームとは異り、本発明のリポゾームにあつては、リン脂質からなる2分子型内にある親水性基と油性分子とが相互に作用して、あたかもW/O/W複合エマルジョン型の形態をとり、複合エマルジョンとしての性質と、従来のリポゾームの安定性とも兼備した効果であると考えられる。

以下本発明を詳述する：

本発明に係るリン脂質は通常リポゾームの原料として用いられる物質であれば特に限定されるものではなくて、一般式X-Yで表わされる化合物、例えばレシチン、フォスファチジル-エタノールアミン、リソレシチン、リソフォスファチジルエ

- 7 -

ラムクロマトグラフィ（生化学実験講座第3巻、脂質の化学：258～259頁、東京化学同人出版）で分別する際、クロロホルムまたはクロロホルム・メタノール液（100：1～50：1）で洗出す留分であつて純粋のレシチンに8～30重量%の油性物質、例えばトリグリセリドおよびカルテノイドなどが混入した混合物である。この油性物質は、脂質中に3～35重量%、好ましくは5～25重量%存在するよう適宜含有量の選択ができる。

この含有量が上記上限を越すと、膜形成能が損われて、カプセル収率の低下を来し、油性物質の効果が期待できなくなるので留意すべきである。なお、本発明の原料に前記のステロール類およびリポゾーム形成の荷電状態を変化せしめる物質、例えば負の荷電付与のためのホスファチド酸、リン脂質セチルまたは牛脂のガングリオンド或いは正の荷電付与のためのステアシルアミンなどを添

- 9 -

特開55-153713(3)

タノールアミン、フォスファチジルセリン、フォスファチジイルノシトール、スフィンゴリエリン、カルジオリピンなどの単独または、それらの混合物であるが、必要に応じてコレステロール、エルゴステロールなどのステロールを共存させてもよい。

また本発明に係る油性物質はトリグリセリドおよびロウなどの単独または、それらの混合物からなるもので、例えば大豆油、菜油、ゴマ油などの植物油および石炭系或いは石油系由来の炭油油が用いられる。

本発明の膜剤は、前記リン脂質と油性物質との混合物を原料として、常用のリポゾーム製法で作ることができる。この際、原料として粗レシチン単独または油性物質との混合物を用いると一層よい効果が発現される。

ここで言う“粗レシチン”とは卵黄、大豆油などから由来するリン脂質に含む成分をアルミナカ

- 8 -

三成分として混在せしめてもよい。この際三成分の添加量は使用するリン脂質の性質に応じて適宜に定めればよく、通常原料の9～10重量%である。

リポゾーム^製製造用原料の使用量は、リポゾーム懸濁液1ml当り1～50.0mgである。

本発明に於けるリポゾーム製剤の製造には公知の技術が用いられるが、W/O/W複合型エマルジョン形態を形成させるために遊離剤として水相溶液を使用する。例えば本発明の原料を母液フィルムとして、このフィルムを油性物質を含有する遊離剤と接触させて攪拌分散せしめた後に、この分散系に超音波振動を与える方法、或いは水に溶けない溶媒に本発明の原料を溶解させた溶液と、油性物質を含有する水相溶液とを混合後、超音波処理してリポゾーム分散体を形成せしめ、次いで分散体を含む溶液を水相溶液の共存下に急速処理を行なう方法、更にガラスビーズなどの夾道に

- 67 -

- 10 -

本発明の膜材を被覆した後に、この被覆されたビーズと活性物質含有溶液とを混合分散処理する方法が用いられる。

本発明で使用する活性物質としては、インシュリン、オキシトシン、バソプレシン、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)、黄体形成ホルモン放出ホルモン (LH-RH) などのペプチドホルモン、黄体ホルモン、エストロゲン、プロゲステロン、アンドロゲンなどの副腎皮質ホルモン、プロスタグランジンなどのホルモン、炭水化物クロラムブテル、ストレプトノシン、メソトレキサート、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド、マイトマイシンC、ブレオマイシン、多経路系抗腫瘍剤などの抗癌剤、ペニシリン、セファロスポリン、ストレプトマイシンなどの抗生物質、アミノグリコシド、インペルターゼなどの酵素剤を例示することができる。その他、副作用の軽減あるいは併発性の改良を認む医薬品を活性物質と

-11-

比較すると、薬物保持能力が格段に改善されているので、特に生体内で不安定な活性物質の保送剤として使用可能であり、また投与時の不可避免的過剰高濃度によつて生ずる副作用を緩衝性を利用して避けることができるなど優れた効果を発揮し得るものである。

本製剤の投与としての利用に就いては、経口、経皮、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内、直腸内、膈所などの諸経路による投与が可能であるが、特に皮下、筋肉内又は膈所投与が好ましい。投与法は投与方式、経路、活性物質の種類ならびに治療の経路に左右されるが、大略は、通常1日当り活性物質投与量の1~0.1倍であつて、かつ投与間隔の延長が可能である。

例えば、インシュリンでは、従来日量0.1~4mgを3回に分け、毎日筋肉内注射していた成人に対し、本発明による製剤0.3~2.0mgを2~7日に1回筋肉内注射して同一効果を得た。

-13-

特願55-153713(4)

して広く利用することができる。

上記の方法で得られる本発明のリボゾーム製剤は、平均粒径0.01~10ミクロン程度の粒子種分布の狭い粒子からなつており特に平均粒径0.5~5ミクロン程度の比較的大型のリボゾーム粒子で粒子径の均一なものが容易に得られる。この粒子は柔軟性に富み、かつ2000~4000 r.p.m.程度の低速遠心分離速度が可能であり、更に膜融合の再分散は、特に超音波処理によらず、軽く振盪するだけで行われて、もとの分散状態に復元するなどの優れた性質を有する。

なお、本発明のリボゾーム製剤は、これの製造時に水系連続相液面上に活性物質の浮上が観察されない事実から、リン脂質の2分子層内に活性物質が混在又は結合して成る膜網を形成していると推定される。

以上の説明で明らかなごとく、本発明に係るリボゾームでは従来のリン質ミセル型リボゾームと

-12-

製剤としては、生理的食塩水に本製剤を懸濁せしめたものが注射薬として使用できる。

本発明のリボゾーム製剤を形成する膜材のみの急性毒性を以下に示す実験例の各膜材についてラットを用いて皮下注射および静脈注射で測定した所、何れも1000mg/kgまでは、何らの毒性徴候も認められず安全と考えられる。

以下実験例を以つて更に詳しく説明する：

(以下省略)

-68-

-14-

実施例 1

市販粗卵リンチン（メルク社製）100mg、コレステロール11.6mgおよびステアリルアミン2.7mgを10mlのクロロホルムに溶解し、この溶液を内容25mlの丸底フラスコに入れ、このフラスコを回転蒸発機に設置して、減圧下88℃でクロロホルムを留去することによってフラスコ内壁にフィルムを形成せしめた。このフラスコにアデノシン-3', 5'-サイクリクシモノホスファート（以下C-AMPと略称する）の1重量当り水溶液を1ml加え、フラスコを80分振盪してフィルムをフラスコ内壁から剝離・分散せしめた後、生成した分散液超音波処理機（日本振興機、NS200-2型）で20分間超音波処理して平均粒径1~2ミクロンの粒子の懸濁分散液を得た。次いでこの懸濁分散液の0.5倍量の食塩水をこれに加え、3000 r.p.m 10分間の遠心分離操作を3回行つて、リボゾーム製剤とリボゾーム内に取り込まれなかつ

-15-

た

- (1) ここで用いた市販粗リンチン（メルク社製）および市販精製リンチン（シグマ社製）の組成は下記の通り：

試料	リン脂質（重量%）	コレステロール（重量%）	油性物質
粗リンチン	93.8	1.1	5.1
精製リンチン	>99.0	0.3	0.2

[※] 抽収率：使用したC-AMPに対する、リボゾームに抽収されたC-AMPの重量率。

^{※※} 保持率：37℃に24時間保つた後のC-AMPのリボゾーム内の残留率。

実施例 2

実施例1におけるC-AMP水溶液の代りに20重量%のグルコース水溶液1mlを用い、その他は実施例1と全く同様な方法を用いて下記第2表に示す組成の各種膜材によるリボゾーム製剤（2-

-17-

特開55-153713(5)

たC-AMP（溶液）とを完全に分離した。かくて得られたリボゾーム製剤を1-1とする。比較のために、第1表に示す組成の膜材を用い、上記と同様な方法でリボゾーム製剤4種、即ち1-2, 1-3, 1-4および1-5を得た。

これらのリボゾーム製剤の抽収率およびC-AMPの膜外放出量の測定値を第1表に示す。第1表に見るごとく、本発明による膜材、粗リンチンを使用することにより従来の膜材を使用したものよりも、抽収率および保持率が格段に改良された。

第 1 表

	試料	膜材組成 (mg)	抽収率 (%)	C-AMPの リボゾーム内保持率 (%)
本発明	1-1	市販粗リンチン 100 コレステロール 11.6 ステアリルアミン 2.7	28	99.2
比較例	1-2	市販精製リンチン 100 コレステロール 11.6 ステアリルアミン 2.7	1.0	89.0
	1-3	市販粗リンチン 100 ステアリルアミン 2.7	3.4	88.9
	1-4	市販粗リンチン 100 コレステロール 11.6	0.6	84.2
	1-5	市販粗リンチン 100	1.6	84.3

-16-

1-2-12)を製造した。膜材に添加した抽収油の量と各リボゾーム製剤のグルコース抽収率の関係を第2表に示す。また、試料2-7, 2-8および2-9について37℃で行つた透過性試験の結果を第3表に示す。これらの表から本発明の有効性が明らかに認められる。

第 2 表

区分	試料	膜材の組成	
		膜基材 (mg)	膜基材に対する 糖質抽出率 (重量%)
本発明	2-1	市販粗リンチン, 100	0
"	2	"	5
"	3	"	10
"	4	"	15
"	5	"	20
比較例	6	"	40
"	7	市販精製リンチン, 100	0
本発明	8	"	5
"	9	"	10
"	10	"	15
"	11	"	20
比較例	12	"	40

-69-

-18-

実施例 3

下記表 3 に示す組成の原料を用い、実施例 1 と同様の方法でフラスコ内壁にフィルムを形成せしめ、これらの各々 K インシュリンのクエン酸緩衝液 (pH 2.5) による希液 (濃度 100mg/10ml) 1ml を添加した後、実施例 1 と同様の方法で 1~2 ミクロン程度の孔径のリボゾーム粒子懸濁分散液とした。これを当量に 24 時間放置した後、6 ml の生理的食塩水で 1 回、生理的食塩水にクエン酸緩衝液を混合した液 (容量比 6 : 1) で 2 回処理し、遠心分離してリボゾーム製剤を得た。この製剤に更にクエン酸緩衝液を加えて、インシュリン濃度を 40 IU/ml (IU は国際単位) に調整した後、下記の試験に供した。

実験：生体内におけるインシュリンリボゾーム

持続性試験

ストレプトゾシンによる人工糖尿病模型 SD 系雄ラットに上記で製造したそれぞれのインシ

- 10 -

特開 55-153713(6)

ニンリボゾームを皮下注射し、前後の血糖値の推移を測定した。第 4 図は、その結果を示すもので、縦軸は注射時の血中グルコース濃度に対する注射後の血中グルコース濃度の比値を示し、横軸は注射後の経過日数を示す。なお、対照としてインシュリン注射剤投与の結果をも併せて示した。第 4 図に見るごとく、従来のリン脂質単液を原料として用いたリボゾーム製剤に比べて本発明の原料を用いたリボゾーム製剤はインシュリン持続性において (血糖低下時間の長いこと) 著かに優れている。

表 3 原料

区分	試料	原料の組成			
比較例	3-1	市販精製レシチン 100mg	コレステロール 11.6mg	卵アルブミン 2.7mg	結晶油 0mg
本発明	3-2	同上	同上	同上	" 6mg
	3-3	同上	同上	同上	" 12mg
	3-4	市販粗レシチン 100mg	同上	同上	" 0mg

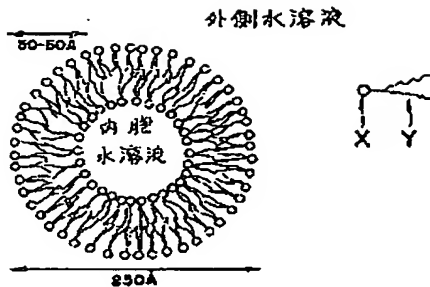
- 20 -

4. 図面の簡単な説明

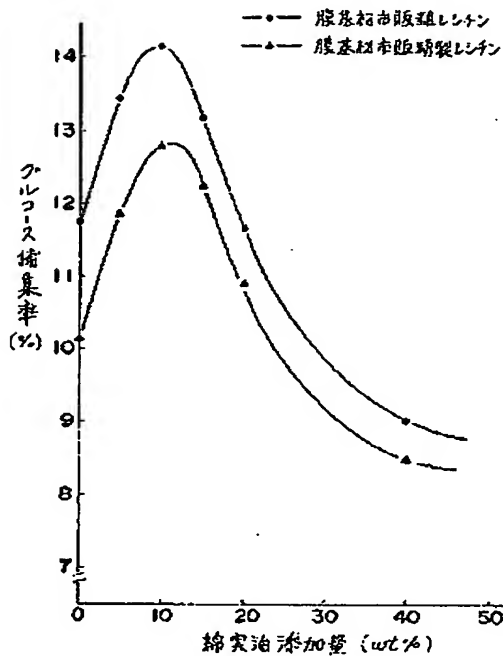
第 1 図は各成分リボゾームの模式図を示し、第 2 図は原料組成中、糖鎖添加物がグルコース濃度におよぼす影響を、第 3 図は内包されたグルコースの透過性試験結果を、および第 4 図は各種インシュリンリボゾームの持続性試験結果をそれぞれグラフ図表で示したものである。

発明人 (氏名) 長谷川化学工業株式会社
代理人 宮田 正 雄
代理人 川口 義 雄

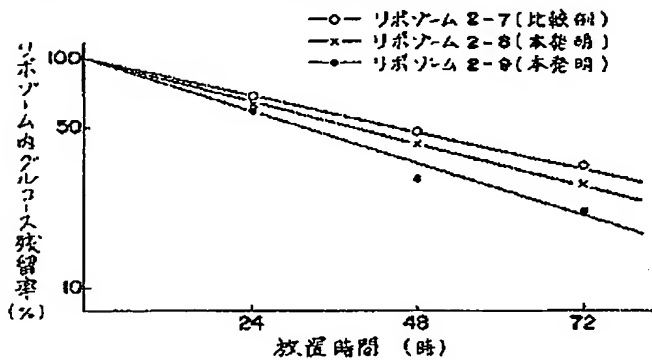
第 1 図



第 2 図

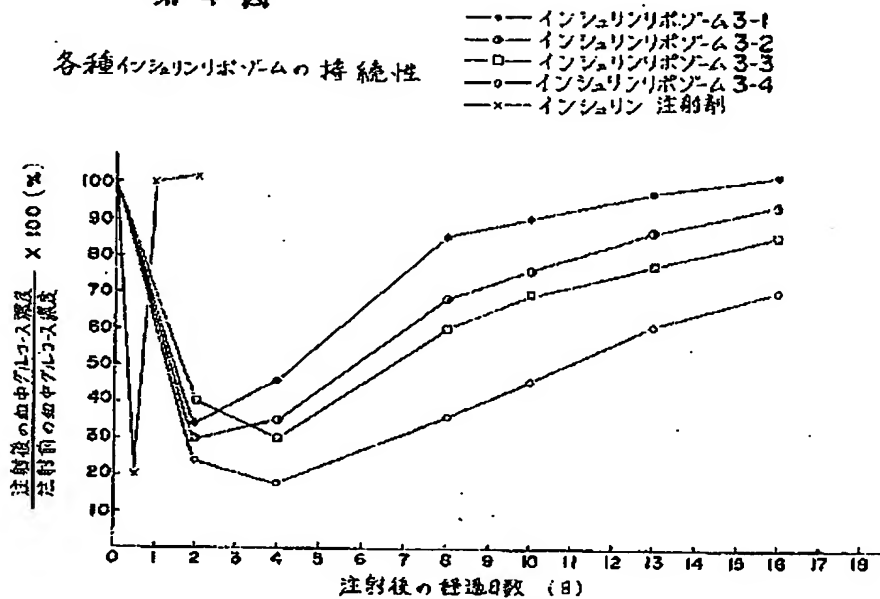


第 3 図 グルコース透過性試験



第 4 図

各種インシュリンリボソームの持続性



手続補正書(方式)

昭和54年8月2/日

特願55-153713(8)

特許庁長官 川原 能雄 殿

1. 事件の表示 昭和54年特願第54288号

2. 発明の名称 活性物質含有リボソーム製剤

3. 補正をする者

事件との関係 発明者

名称 (110) 兵羽化学工業株式会社

4. 代理人 東京都港区初台1丁目1番14号 山田ビル

(特許番号 160) 電話 (03) 854-8623

(7027) 弁護士 宮田 広 彦

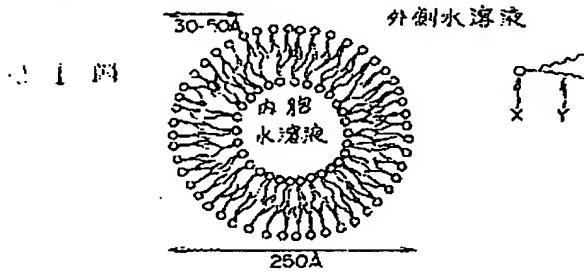
(ほか1名)

5. 補正命令の日付 昭和54年7月7日

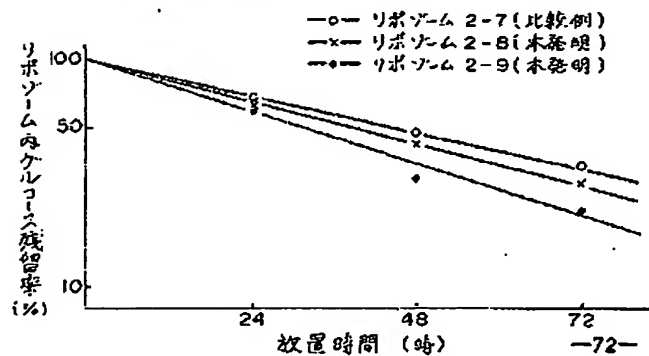
6. 補正により増加する発明の数

7. 補正の対象 図面

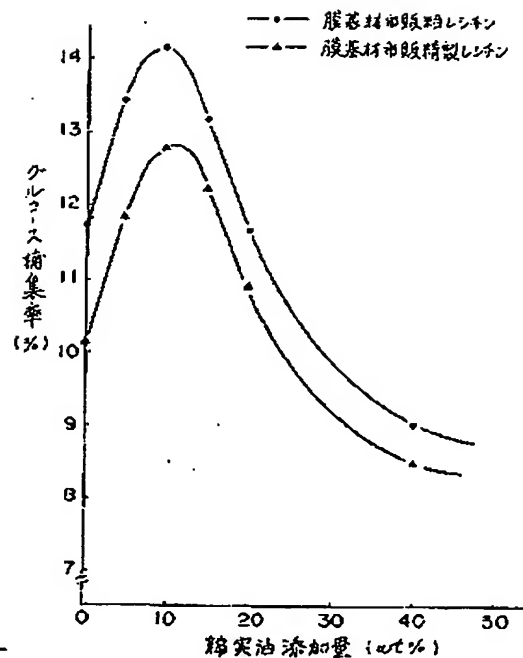
8. 補正の内容 図面を別紙の通り補正する。



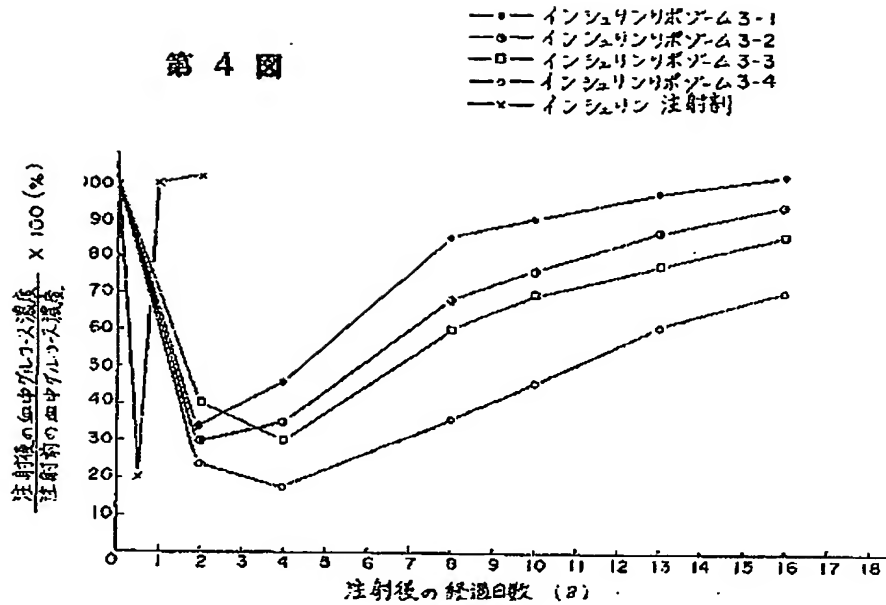
第3図



第2図



第 4 図



手 続 補 正 書

昭和55年 6月24日

通

特許庁長官 川 原 龍 雄 殿

1. 事件の表示 昭和 54 年 特 願 第 54283 号

2. 発明の名称 活性物質含有リボソーム製剤

3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人

名 称 (110) 貝羽化学工業株式会社

4. 代 理 人 東京都港区新橋3丁目1番14号 山田ビル
(郵便番号 100) 電話 (03) 354-8683 電
(7027) 弁 理 人 山 田 広 (姓名)

5. 補正命令の日付 昭和 55 年 6 月 25 日

6. 補正により増加する発明の数

7. 補正の対象 願書中、発明の名称の欄、明細書全文
及び図面

8. 補正の内容

(1) 願書中、発明の名称の欄に「活性物質含有リボソーム製剤」とあるのを、「活性物質含有リボソーム」と補正する。

(2) 明細書全文を別紙の通り補正する。

(3) 図面第5図乃至第8図を別紙の通り補充する。

(4) 図面中第1図を別紙添付の通り補正する。

明 細 書

1. 発明の名称

活性物質含有リボゾーム

2. 特許請求の範囲

- (1) リン脂質の2分子層内に該リン脂質に対して3乃至20重量の油性物質の分子が存在している構造を有する膜から形成されているリボゾームであつて、その内腔に活性物質を含有して成る活性物質含有リボゾーム。
- (2) 上記リン脂質がレシテンである特許請求の範囲第(1)項に記載のリボゾーム。
- (3) 上記油性物質が植物油、ロウおよびトリグセライドから成る群から選択される油性物質の1種であるか又は2種以上の混合物である特許請求の範囲第(1)項記載のリボゾーム。
- (4) 上記脂質が少なくとも1種の油性物質を、かつとも3重量も含有する相レシテンから成る特許請求の範囲第(1)項記載のリボゾーム。

- 1 -

化合物、例えばレシテン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンなどの純粋なリン脂質を原料として用いて形成した、少なくとも1層の2分子層を有する閉鎖ラメラ（ミセル）構造を有する小胞、すなわち、リボゾームの内腔水溶液中に生理活性物質を含有して成るリボゾームを提案している。この活性物質含有リボゾームは、過酷な条件下、例えば、胃腔内においてもリボゾームを形成している組織がその内腔水溶液中の活性物質を保護しているので、該リボゾームを経口投与した場合でも上記活性物質の活性が損われることがない。また、このリボゾームはその粒径に応じて生体内の組織に対する浸透性が変化するもので、この粒径の大きさを調整することにより上記組織に対する活性物質の浸透性を高めることが可能となる。したがって、上記リボゾームはそれが含有する生理活性物質を特定の生体組織へ選択的に供給することを可能にするものとして極めて注

- 3 -

3. 発明の詳細な説明

本発明は活性物質、特に生理活性物質を含有するリボゾームに関する。

従来、薬物のごとき生理活性物質を生体内に直接投与した場合には(1)薬物に対する抗体増殖と云う免疫学的問題、(2)薬物が標的以外の組織にまでも取り込まれて生ずる副作用拡大の問題、あるいは逆に、(3)薬物が標的組織を遊過し難いため生ずる問題、更に(4)薬物が体内酵素による分解その他で活性を維持し難い問題の生ずる場合が多い。

而して、上記したとき問題は、薬物のような生理活性物質を、それを保護しつつ生体内の標的組織に直接に運び得る担体に担持して投与すれば解決されることになる。

上述した見地から、近年、特開昭49-118826号は、一般式X-Y（式中、Xは活性親水性基を、Yは非活性疎水性基を示す）で表わされる

- 2 -

目される。

しかしながら、上記提案されたリボゾームを形成している。上述したとき純粋なリン脂質から成っている膜は柔軟性に欠けると共に、その機械的強度も不十分であるという欠点がある。また、このリボゾームにおいてはその内腔に含まれる生理活性物質の外部への流出速度が速大であるため、生理活性物質を生体内で継続に放出する性質、いわゆる上記活性物質の徐放性の点で必ずしも満足のでない。特に、上記リボゾームはそれを形成している脂質のグルーゾル溶解性以上の膜条件下では上記活性物質の流出速度が著しく上昇する欠点を有する。

上記リボゾームにみられる上記欠点のうち、リボゾームを形成している脂質の強度を改善する目的でコレステロールのごときステロール系脂質を、原料としての脂質リン脂質に混在させることが提案されている。しかし、この提案によるとリ

ボゾームを形成する膜の強度は幾らか増大するが、上記活性物質の除放性は未だ不満足である。

本発明者は、活性物質含有リボゾームにおける上述した現況にかんがみ、膜の強度が高く、かつ生理活性物質の体内における除放性が良好をリボゾームを提供すべく検討した結果、粗レンテンのごとき、油性分子を含有するリン脂質を膜材として用いて形成したリボゾームの壁膜が、従来公知の純粋なリン脂質を膜材として用いて形成したリボゾームの壁膜に比して柔軟性に富むと同時に、その内側に含まれる生理活性物質の生体内における除放性に優れていることを見出した。

すなわち、油性物質の分子が溶解又は結合したリン脂質から形成されるリボゾームが上述したごとき特性を示すことは驚異的であると言ひ得る。

本発明の目的は、活性物質含有リボゾームにおいて、その壁膜の強度が高く、かつ上記活性物質の生体内における除放性が良好な新規なリボゾーム

- 5 -

述のごとくリン脂質に油性物質が溶解又は結合したもので成る。ここで用いるリン脂質は、従来リボゾームの膜層として用いられているものであれば特に限定されるものでなく、例えばレンテン、フォスファチジル-ニグノールアミン、リゾレンテン、リゾフォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルセリン、フォスファチジルイノシトール、スフィンゴミリエリン、カルジオリビンなどの単体または、それらの混合物であつて、必要に応じてコレステロール、エルゴステロールなどのステロール類を含有していてもよい。

また、上記リン脂質に溶解又は結合させる油性物質は、トリグリセリド、ロウ又は動物油或はこれらの混合物であつて、例えば大豆油、種菜油、ゴマ油のごとき植物油および石炭系或は石油系由来の炭化水素油から採られる。

本発明においては、粗レンテンは単独またはこれに上述したごとき油性物質を混合して用いるの

- 7 -

を提供することである。 特許第55-153713(11)

本発明のその他の目的は以下の記載から明らかになるであろう。

本発明の管轄は、ミセル膜層から成る壁膜により形成される小腔内に活性物質を包含するリボゾームにおいて、油性物質の分子が存在するリン脂質から成るミセル膜層を膜リボゾームの壁膜として用いることである。

また、本発明の上記壁膜を用いて形成した活性物質含有リボゾームの特性は、ここに添付の第1図に示すごときW/O/W型の複合エマルジョン形態を有し、生体内において上記活性物質のリボゾーム外腔への優れた除放性を示すことである。

第1図において、Xは親水性基を、Yは疎水性基をそれぞれ示し、Pは水性溶液を含有する小腔を示し、Qはリボゾームの外腔における水性溶液を示す。

本発明のリボゾームを形成するための壁膜は上

- 6 -

が特に好ましい。

ここで用いる“粗レンテン”という用語は、卵黄、大豆油のごとき物質から由来するリン脂質に富む成分をアルミナカラムクロマトグラフィーで分別する際、クロロホルム又はクロロホルムとメタノールの混合液(100:1乃至8:2の割合の混合液)で抽出する成分であつて、純粋のレンテンに97乃至99.3乃至20重量部の油性物質、例えばトリグリセリドおよびカロチノイドが溶解した混合物から成るものを意味する。この粗レンテンを膜材として用いてリボゾームを形成するに当つては、形成されるリボゾームの壁膜中に上記油性物質が8乃至20重量部、好ましくは5乃至15重量部存在するように粗レンテン中油性物質の含量を調整する。なお、上記壁膜中の油性物質の含量が20重量部を越えると壁膜の形成が阻まれてリボゾームの収率が低下するので留意すべきである。一方、上記壁膜中の油性物質の合計が

- 75 -

- 8 -

3 重量%より低くなると上述した本発明の目的が達成されなくなる。

また、本発明のリボゾームの形成に際して、上記膜材にコレステロール、エルゴステロールのごときステロール類およびリボゾーム表面の荷電状態を変化し得る物質、例えば負の電荷付与のためのホスファチド酸、リン酸ジセチルまたは牛脂のガングリオシド或いは正の電荷付与のためのステアリルアミンなどを第三成分として混在せしめてもよい。この第三成分の添加量は使用するリン脂質の性質に応じて適当に定めればよく、通常膜材の0~10重量%である。

上記リン脂質と油性物質が混在する混合物を膜材として用いて本発明のリボゾームを形成するには、従来法を適用し得る。例えば、上記膜材を降膜フィルムに形成し、このフィルムを活性物質を含有する連続相と接触させて降膜分散させたもの、この分散系に超音波振動を与えする方法、或は水に

- 9 -

してリボゾーム収率の向上、およびリボゾームの形成後のリボゾームの分離操作の容易性、リボゾームの粒径の均一性、リボゾームの膜の柔軟性と強度の向上、リボゾームの内部に包含される活性物質の生体内における徐放性の改善をもたらすものである。

本発明のリボゾームの形成に際して使用される活性物質、特に生理活性物質としては、インシュリン、オキシトシン、バソプレシン、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、黄体ホルモン放出ホルモン(LH-RH)カルシトニン、スタチンのごときペプチドホルモン、黄体ホルモン、卵胞ホルモン、副腎皮質ホルモンのごときステロイドホルモンおよびプロスタグランジン、アデノシン-3',5'-サイクリックモノホスファートのごときその他のホルモン、或いはクロラムブテル、ストレプトゾトシン、メソトレキサート、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド、マイトマイシン

- 11 -

特開昭55-153713(12)

不溶性溶媒に上記膜材を溶解した溶液と、上記活性物質を含有する水相溶液とを混合液、超音波処理してリボゾーム前駆体を形成せしめ、次いで前駆体を含む溶液を水相溶媒の共存下に超遠心処理を行なう方法、更にガラスビーズなどの表面に上記膜材を被覆した後、この被覆したビーズを上記活性物質含有溶液と混合して該溶液中に分散させる方法を採用し得る。上記リボゾームの形成に際して用いる上記膜材の量はリボゾームが盛留している液1ml当り1~500μgである。

上述のごとくして得られる本発明のリボゾームはそれを形成している膜材中のリン脂質が有する疎水性基と膜材中に存在する油性物質の分子とが相互に作用して形成したものであつて公知の純粋なリン脂質ミセル型のリボゾームとはその構造が本質的に相違していると言ひ得る。

また、本発明のリボゾームの製造に際して油性物質は、膜材からのリボゾームの形成に際

- 10 -

し、ブレンダマイシン、多糖体系抗腫瘍剤などの抗腫瘍剤、ペニシリン、セファロスポリン、ストレプトマイシンなどの抗生物質、アミノグルコシダーゼ、インペルターゼなどの酵素剤を例示することが出来る。

本発明のリボゾームは、平均粒径0.01~10ミクロン程度の粒子径分布の狭い粒子からなつており特に平均粒径0.5~5ミクロン程度の比較的大型のリボゾーム粒子で粒子径の均一なものが容易に得られる。この粒子は柔軟性に富み、かつ8000~4000 r.p.m.程度の低速遠心による凝縮が可能であり、更に凝縮後の再分散は、特に超音波処理によらず短時間凝集するだけで行われて、もとの分散状態に復帰するなどの優れた性質を有する。

本発明のリボゾームは、上述のごとき特性から溶解されるように、従来のリン脂質ミセル型リボゾームと比較してその内部に含有する活性物質

- 76 -

- 12 -

の保持能力が格段に低れており、かつ、既述したごとく上記活性物質の徐放性も良好であるので、生体内で不安定な薬物、および不可逆的な過剰量の投与により副作用を生ずる薬物の保藏剤として特に好適である。したがって、本発明のリボゾームは医薬として有効に利用し得る。

例えば、本発明のリボゾームをインシュリン注射液として適用すると従来日量0.1~4mgのインシュリンを3回に分け、毎日筋肉注射していた成人に対し、本発明による製剤0.2~20mgを2~7日に1回筋肉注射して同一効果を得ることが出来る。

本発明のリボゾームは医薬として利用する場合には、経口、経皮、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内、直腸内、局所などの諸経路による投与が可能であり、特に皮下、筋肉内或いは局所投与が好ましい。投与量は投与方式、経路、活性物質の種類ならびに治療の程度に左右されるが、大略は、通常1日

- 13 -

均一に保持し得、したがって、該物質の効果を十分に発揮することができ、かつ副作用も抑制し得る。

本発明のリボゾームを形成するための前記膜材の急性毒性を、以下に示す各実施例で用いた膜材についてラットを用いて皮下注射および静脈注射を行つて測定した結果、何れも1600mg/kgまでは何らの毒性徴候も認められなかつた。したがって、本発明のリボゾームは医薬として安全に適用し得る。

以下に実施例を示して本発明を具体的に説明する。

実施例 1

市販粗製炭レンテン（メルク社製）100mg、コレステロール1.6mgおよびステアシルアミン2.7mgを1mlのクロホルムに溶解し、この懸液を内容25mlの丸底フラスコに入れ、このフラスコを回転蒸発機に設置して、減圧下38℃でク

- 15 -

特開55-153713(13)

過り活性物質投与量の0.1~1倍であつて、かつ投与回数の延長が可能である。

なお、本発明のリボゾームは生理的食塩水に懸濁させることにより注射薬剤として使用し得る。

特に、本発明のリボゾームにおいて活性物質としてペプチドホルモン類を含む各種ペプチド性生理活性物質を含有したリボゾームは皮下又は筋肉内注射剤として適用すると卓効を発揮する。一般に、ペプチド性生理活性物質は生体内での分解が速いのでその効果を維持するためには該物質の頻回投与（注射）が必要となり、したがって、患者の負担が大きくなるのみでなく、上記物質の血中濃度に大きな変動がみられ、その結果該物質の投与効果が低下し、かつ副作用が顕現し易くなる。

これに対し、本発明のリボゾームは後記実施例に示すごとく、皮下又は筋肉内注射においても優れた徐放性を示すので投与回数を大巾に減らし得ると共に、ペプチド性生理活性物質の血中濃度を

- 14 -

コロホルムを留置することによつてフラスコ内壁にフィルムを形成せしめた。このフラスコにアデノシン-3', 5'-サイクリクヌモノホスフェート（以下C-AMPと略称する）の1重量当り水懸液を1ml加え、フラスコを30分間振盪してフィルムをフラスコ内壁から剝離・分散せしめた後、生成した分散液を超音波処理機（日本精機社、NS200-2型）で20分間超音波処理して平均粒径1~2ミクロンの粒子の懸濁分散液を得た。次いでこの懸濁分散液の6倍量の生理的食塩水をこれに加え、3000 r.p.m. 10分間の遠心分離操作を3回行つて、形成されたリボゾームとリボゾーム内に取り込まれなかつたC-AMP（粘液）とを完全に分離した。かくて得られたリボゾームを1-1とする。比較のため、第1段に比較例として示す組成の膜材料を用い、上記と同様な方法でリボゾーム4種、即ち1-2、1-3、1-4および1-5を得た。

- 77 -

- 16 -

特開55-153713(14)

これらのリボゾームのC-AMPの捕収率およびC-AMPの膜外放出量の測定値を第1表に示す。第1表に見ると、本発明による膜材、粗レンチンを使用することにより従来の膜材を使用したものよりも、捕収率および保持率が著段に改良された。

第 1 表

試料	膜材組成 (μg)	捕収率 (%)	C-AMPの リボゾーム内保持率 (%)
本発明			
1-1	市販粗レンチン 100 コレステロール 11.8 ステアリン酸 2.7	2.8	99.2
比較例			
1-2	市販精製レンチン 100 コレステロール 11.8 ステアリン酸 2.7	1.0	89.0
1-3	市販粗製レンチン 100 ステアリン酸 2.7	3.4	88.9
1-4	市販粗製レンチン 100 コレステロール 11.8	0.6	84.2
1-5	市販粗製レンチン 100	1.6	84.3

注

(1) ここで用いた市販粗レンチン(メルク社製)および市販精製レンチン(シグマ社製)の組成は下記の通り:

-17-

び2-9について37℃で行ったグルコースの透過性試験の結果を第3図に示す。これらの図から本発明のリボゾームの膜性が明らかに認められる。

第 2 表

区分	試料	膜材の組成	
		膜材 (μg)	膜材に対する 総膜添加率 (重量%)
本発明	2-1	市販粗レンチン, 100	0
"	2	"	5
"	3	"	10
"	4	"	15
"	5	"	20
比較例	6	"	40
"	7	市販精製レンチン, 100	0
本発明	8	"	5
"	9	"	10
"	10	"	15
"	11	"	20
比較例	12	"	40

-19-

捕収率: 使用したC-AMPに対する、リボゾームに捕収されたC-AMPの重量率。

保持率: 37℃に24時間保持した後のC-AMPのリボゾーム内の残存率。

試料	リン脂質 (重量%)	コレステロール (重量%)	油性物質
粗レンチン	93.8	1.1	5.1
精製レンチン	98.5	0.3	0.2

実施例 2

実施例1におけるC-AMP水溶液の代りに20重量%のグルコース水溶液を用い、その他は実施例1に記載と全く同様の手順で下記第2表に示す組成の各種膜材からリボゾーム(2-1乃至2-12)を形成した。膜材の成分である粗製油の量と各リボゾームのグルコース捕収率の関係を第2図に示す。また、試料2-7、2-8および

-18-

実施例 3

下記第3表に示す組成の膜材料を用い、実施例1に記載と同様の手順でプラスチック内面にフィルムを形成せしめ、これらの各々に、クエン酸緩衝液(pH 2.3)10mlおよびインシュリン10mgを含む溶液を加えた後、実施例1に記載と同様の手順で1~2ミクロン程度の粒径のリボゾーム粒子懸濁分散液を調製した。これを室温に24時間放置した後、6%の生理的食塩水で1回、生理的食塩水にクエン酸緩衝液を混合した液(容積比6:1)で2回処理し、遠心分離してリボゾームを得た。このようにして得られたリボゾームに更にクエン酸緩衝液を加えて、インシュリン濃度を40IU/ml(1IUは国際単位)に調整した後、下記の実験に供した。

実験: 生体内におけるインシュリンリボゾーム

持続性試験

ストレプトゾシンによる人工糖尿病誘発SD

-20-

-78-

系雄ラットに上記で製造したそれぞれのインシュリンリボゾームを皮下注射し、このインシュリンリボゾームの投与前後の血糖値の推移を測定した。第4図は、その結果を示すもので、縦軸は注射後の血中グルコース濃度に対する注射後の血中グルコース濃度の比値を示し、横軸は注射後の経過日数を示す。なお、対照としてインシュリン注射前後の投与の結果をも併せて示した。第4図に見ると、本来油性物質を含有している粗レンチンを用いて調製した本発明のリボゾームを用いたラット体内にインシュリンの持続性（低い血糖値が長時間保たれること）は、油性物質を含有しない精製インシュリンを用いて調製した従来のリボゾームを用いた場合に比し顕かに優れている。

（以下略）

-21-

コレステロール 1.6 mg およびステアリン酸 2.7 mg を 1.0 ml のクロロホルムに溶解し、この溶液を内容 25 ml の丸底フラスコに入れ、このフラスコを回転蒸発機に設置して、減圧下 38℃ でクロロホルムを留去することによってフラスコ内壁にフィルムを形成せしめた。

上記フラスコにトリチウムで標識した、黄体形成ホルモンの放出ホルモン（250 μ Ci / 7.3 μ g, New England Nuclear 社製、以下該ホルモンを 3 H-LH-RH と略称する）の 1 μ g / ml 含有生理的食塩水溶液を 1 ml 加え、ついで上記フラスコを 89 分振盪してフィルムをフラスコ内壁から剝離・分散せしめた後、生成した分散液を超音波処理機（日本精機社、NS200-2型）で 5 分間超音波処理して平均粒径 1 ~ 2 ミクロンの粒子の懸濁分散液を得た。次いでこの懸濁分散液の 3 倍量の生理的食塩水をこれに加え、3000 r. p. m. 10 分間の遠心分離操作を 2 回行つて、形成されたリボゾ

-23-

区分	試料	投 材 の 組 成			
比較例	3-1	市販精製レンチン 100mg	コレステロール 1.6mg	ステアリン酸 2.7mg	総油脂 0mg
本発明	3-2	同 上	同 上	同 上	〃 6mg
	3-3	同 上	同 上	同 上	〃 12mg
	3-4	市販粗レンチン 100mg	同 上	同 上	〃 0mg

実施例 4

本例は本発明のリボゾームに内包された活性物質が生体内において如何なる推移を示すかを示したものであつて、上記活性物質としてトリチウムで標識した黄体形成ホルモンを放出するホルモン（New England Nuclear 社製）を用いて下記の各試験を行つた。

なお、各試験に用いたリボゾームは次のような手順で調製した。

市販粗卵黄レンチン（メルダ社製）100 mg、

-22-

ームとリボゾーム内に取り込まれなかつた 3 H-LH-RH の溶液とを完全に分離した。リボゾームの 3 H-LH-RH の回収率は 10 % by weight であつた。上述のようにして得られたリボゾームに生理的食塩水を加えて濃度 3.42 μ Ci / ml したものを試料として用いた。

実験 1

上記のようにして調製したリボゾーム試料とリボゾーム形態にしていない遊離形態の 3 H-LH-RH を各マウスに皮下注射し、血中ラジオアイソトープ（RI）量の経時的推移を調べた。使用マウスは ICR マウス種、体重 30 ~ 32 g のもので 1 群 8 匹とした。投与量は一匹当り 0.34 μ Ci とした。血中 RI 量はマウス血液を 0.25 ml 採取し、サンプルオキシダイザー（パッカート社製）で処理後、液体シンチレーションカウンターで測定した。投与後 15 分の血中 RI 量を 100 とし、各経過時間ごとの結果を図 5 に示した。

-24-

第3図から見られるごとく、本発明により調製したリボゾームに内包されたホルモンは生体内で徐々に放出される。

実験 2

上記リボゾーム試料と上記遊離形態の³H-LH-RHをそれぞれラットに皮下注射し、尿および糞中のR I排泄量の経時的推移を調べた。使用ラットはSDラット株、体重100~110gのものであつて、一群3匹とした。上記リボゾーム試料ならびに³H-LH-RHの各投与量は一匹当たり0.68 μCiとした。R Iの生体から排出量は、尿の場合は蒸留水で100 μlに希釈後、又糞の場合は粉末状とした後、サンプルオキシダイザーで処理し、液体シンチレーションカウンタで測定した。結果は上記投与量を100とした各時間毎の回収R I量を計算した形で第6図に示した。なお糞中にはR Iは放出されなかつた。

第6図から、本発明により調製したリボゾーム

-25-

得る。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明のリボゾームの模式図を示したものであり、第2図は活性物質としてグルコースを内包した本発明のリボゾームにおいて該リボゾームを形成している原料中の油性分子の存在量と上記グルコースの採取率との関係を示したものであり、第3図は活性物質としてグルコースを内包した本発明のリボゾームと比較例のリボゾームとにおける上記グルコースのリボゾームに対する透過性の比較を示したものである。

第4図は活性物質としてインシュリンを内包した本発明のリボゾームの生体内におけるインシュリンの血糖降下作用の持続性を比較例と対比して示したものであり、第5図乃至第8図は本発明のリボゾームのそれが内包した活性物質の生体内における放出性を示したものであつて、

-27-

特開55-153713(6)

に内包されたホルモンは生体内で徐々に放出されることが理解し得る。

実験 3

上記リボゾーム試料と遊離形態の³H-LH-RHをマウスに皮下注射し、その各投与部位における経時的残留R I量を追跡して測定した。使用動物はICRマウス雄で、体重30~32gのものを1群2匹とした。上記各試料の投与量は一匹当たり0.165 μCiとした。残留R I量は投与部位を取り出し、SOLVENT (バウカード社製)で溶解後、液体シンチレーションカウンタで測定した。試験結果は遊離形態の³H-LH-RHを投与した場合は第7図に示すとおりR Iの残留量は短時間で著しく減少するが、これに対しリボゾーム形態の試料を投与した場合は第8図に示すとおりR Iの残留量は極めて緩慢に減少する。

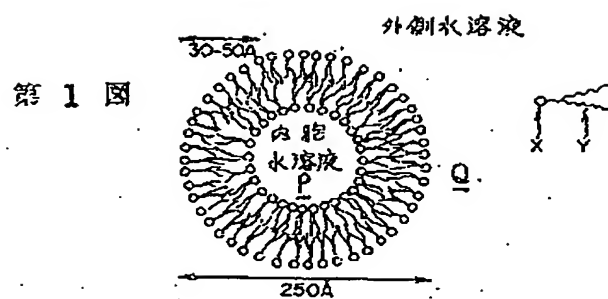
上記の実験1~3の結果から本発明のリボゾームに内包される活性物質の優れた徐放性が立証し

-26-

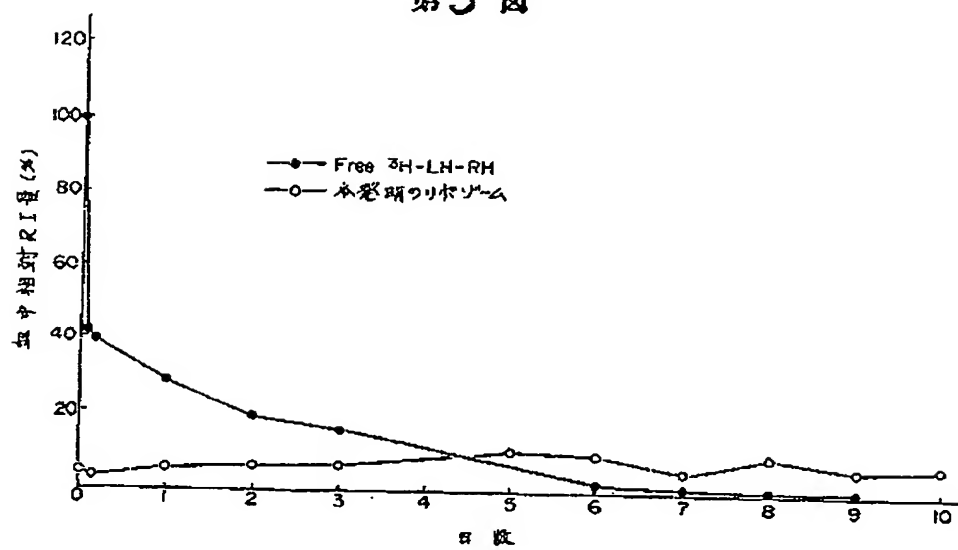
第5図は活性物質として該物質をラジオアイソトープで標識したものをを用いて形成したリボゾームを皮下注射したのちの血中のラジオアイソトープの量の経時的変化を示しており、第6図は上記のごとく標識した活性物質を内包したリボゾームを皮下注射したのちの尿中のラジオアイソトープの量の経時的変化を示しており、第7図は比較例として上記標識した活性物質をそのまま皮下注射したのち投与部位におけるラジオアイソトープの残留量の経時的変化を示しており、および第8図は上記標識した活性物質を内包したリボゾームを皮下注射したのちの投与部位におけるラジオアイソトープの残留量の経時的変化を示したものである。

-80-

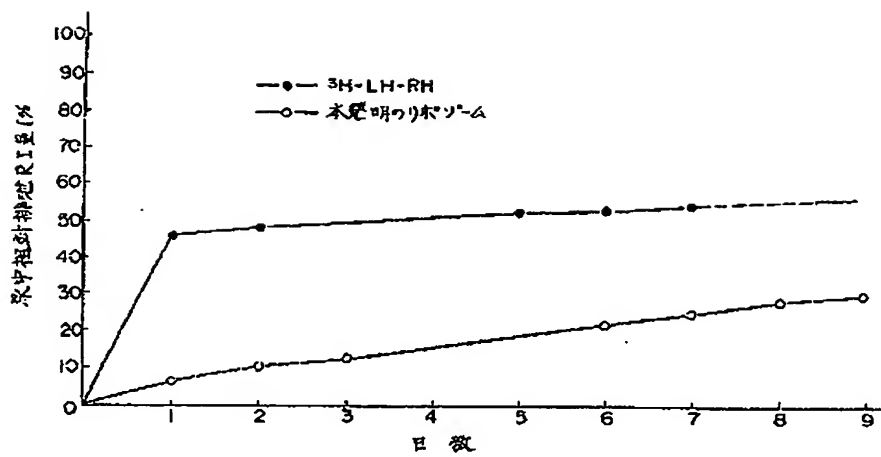
-28-



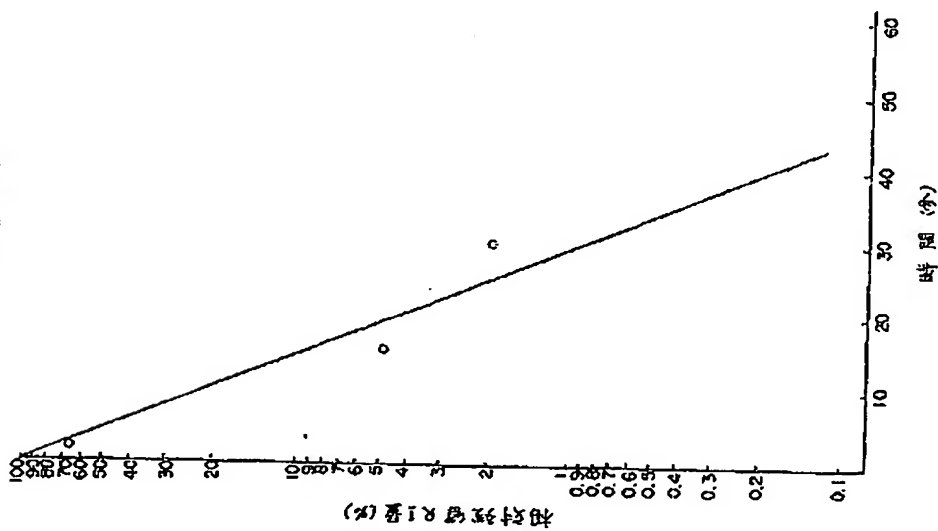
第5図



第6図

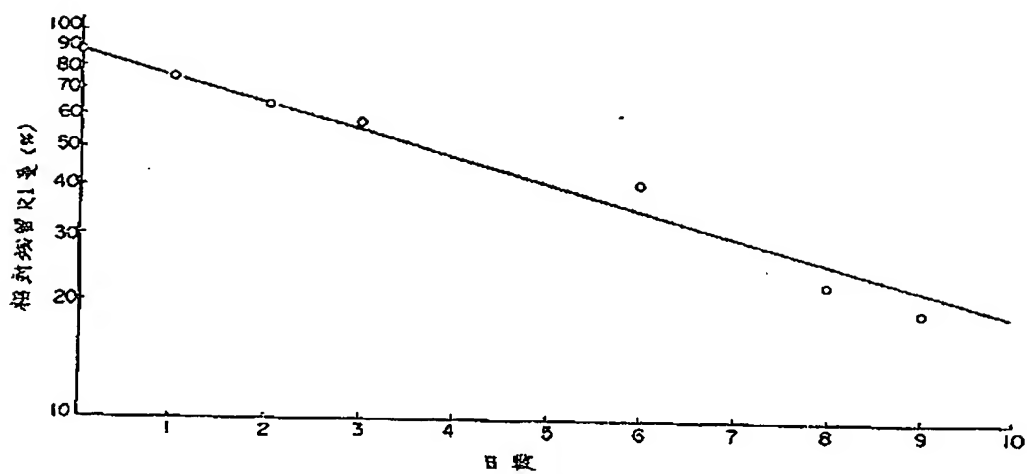


第7図



第 8 圖

特開 昭55-153713 (19)



61. 5. 19 57

特許法第17条の2の規定による補正の掲載

昭和54年特許願第54893号(特開昭55-153713号、昭和55年11月29日発行 公開特許公報55-15388号掲載)については特許法第17条の2の規定による補正があったので下記のとおり掲載する。 3 (2)

Int. Cl. 4	識別記号	庁内整理番号
A61K 9/14		8742-4C

手続補正書

昭和61年2月17日

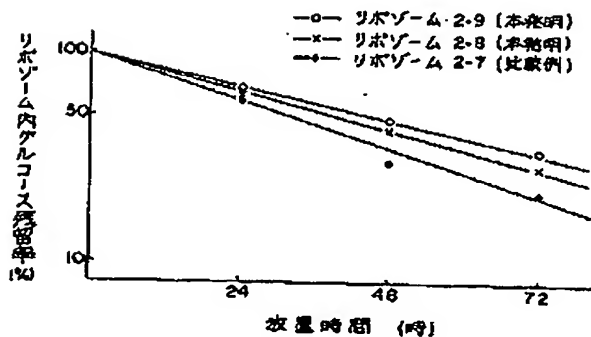
特許庁長官 早 賀 延 郎 殿

1. 事件の表示 昭和54年特許願第54283号
2. 発明の名称 活性物質含有リボゾム
3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人
名 称 (118) 興和化学工業株式会社
4. 代 理 人 東京都新宿区新宿一丁目1番14号 山田ビル
(郵便番号 160) 電話 (03) 354-8823
(6202) 弁護士 山 口 誠 哉
5. 補正命令の日付 自 記
6. 補正により増加する発明の数
7. 補正の対象 図面
8. 補正の内容 該附図面中、第3図を別紙の通り補正する。

特許
01.2.20
山田ビル
本署

方式
審査
印

第 3 図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.